

Application d'une technique E.L.I.S.A. au diagnostic sérologique de la toxoplasmose ovine : son intérêt pour les petits ruminants sahéliens

par B. BERTHET (1) et P. BOURDIN (2)

- (1) Directeur Adjoint au Laboratoire départemental des Services Vétérinaires de l'Isère, 38029 Grenoble Cedex, France.
(2) Ex-Chef du Service de Virologie, L.N.E.R.V., I.S.R.A. Dakar, Sénégal et I.E.M.V.T. Maisons-Alfort ; Adjoint à la Direction départementale des Services Vétérinaires de l'Isère, 38029 Grenoble Cedex.

RÉSUMÉ

Les auteurs présentent une technique de diagnostic immunoenzymatique (ELISA) en microplaque de la toxoplasmose ovine, mettant en œuvre un conjugué marqué à la peroxydase et l'acide amino-5 salicylique purifié, comme substrat révélateur. La coloration très stable permet une lecture soit visuelle soit au densitomètre Vernon, directement dans les plaques de microtitration.

Pour une étude épidémiologique chez les petits ruminants en milieu africain, cette technique permet, pour déterminer le titre en anticorps d'un sérum, l'utilisation de la méthode de dilution unique par comparaison avec une courbe étalon standard. Cette dernière est obtenue à partir de sérums positifs, titrés selon la technique de la dilution finale. Une concordance satisfaisante existe avec la méthode IFI.

L'incidence de la toxoplasmose animale en pathologie africaine a fait l'objet d'études de la part de quelques auteurs dont GARIN et collab. (6) et FALADE (5).

L'intérêt d'une technique immuno-enzymologique en vue de rechercher des anticorps anti-toxoplasmiques chez l'homme est souligné par CARLIER et collab. (3). Pour cet auteur, elle est aussi sensible et satisfaisante que les autres épreuves sérologiques et a sur elles l'avantage de pouvoir être standardisée et automatisée. Enfin, la commercialisation d'antigènes solubles et lyophilisés ne peut que favoriser l'extension de la technique E.L.I.S.A. aux enquêtes sérologiques chez les animaux et en particulier les petits ruminants.

Il est aujourd'hui prouvé que, chez les animaux domestiques, les ovins et les caprins figurent parmi les espèces où les taux de séro-conversion sont les plus importants. Selon les

pays et les techniques utilisés, ils varient entre 10 et 80 p. 100 d'après TAINURIER (11). L'incidence sur les avortements et les mortalités néonatales, variables selon les auteurs, paraît en augmentation depuis une décennie, du moins en France (2). En Ecosse pour LINKLATER et DYSON (7), l'incidence serait de 15 p. 100 pour atteindre 46 p. 100 en Tasmanie d'après MUNDAY (8). Insistons également sur la présence de formes enkystées dans les masses musculaires qui peuvent être une source potentielle de contamination humaine, suite à l'ingestion de viande mal cuite (1).

En pays Sahélien le développement et l'amélioration de l'élevage des petits ruminants est une priorité, en conséquence, il semble intéressant pour les Instituts de recherches en Afrique de disposer d'une technique pratique et fiable pour de futures enquêtes épidémiologiques.

L'objectif de ce travail est orienté vers :

- l'adaptation d'une technique E.L.I.S.A. dans le cadre de la toxoplasmose ovine ;
- la comparaison avec une autre technique sérologique : l'immunofluorescence indirecte ;
- l'application à un programme d'enquête épidémiologique au niveau du département de l'Isère.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL

1. Support solide

La réaction est réalisée sur plaque à fond plat M 29 A (Greiner fabricant). Ces plaques sont choisies pour leur bonne capacité de fixation des antigènes protéiques et leur excellente qualité photométrique.

2. Réactifs

R1. — L'antigène toxoplasmique de nature protéique est présenté sous forme lyophilisée (Biomérieux). Reconstitué par addition de 5 ml d'eau distillée, il correspond à 3,5 mg de protéines par ml. L'antigène soluble est utilisé dilué au 1/500 dans nos conditions d'analyses, en tampon carbonate de pH 9,6 (carbonate de sodium 0,03 M, bicarbonate de sodium 0,07 M) additionné de 0,02 p. 100 d'azide de sodium.

R2. — L'antiglobuline est un anticorps de lapin anti IgG (H + L) de mouton marqué à la peroxydase (Rash/IgG (H + L)/Po Nordic) présenté sous forme lyophilisée. Il est reconstitué par 1 ml d'eau distillée et utilisé dilué extemporanément au 1/1 600, dans nos conditions d'analyses en tampon PBS pH 7,2, additionné de 0,05 p. 100 de tween 20, de 0,5 p. 100 de gélatine et de 0,02 p. 100 d'azide de sodium. La gélatine est dissoute à chaud, et si nécessaire le pH est réajusté à 7,2 par de la soude 0,1 N.

R3. — Le système révélateur est préparé extemporanément en mélangeant :

- 9 volumes d'une solution de 5 AS purifié
- 1 volume d'eau oxygénée à 0,05 p. 100.

La solution de 5 AS (acide amino-5 salicylique) est préparée par dissolution de 60 mg de 5 AS purifié dans 100 ml d'eau distillée bouillie et ramenée à 80 °C environ puis refroidie

ensuite à + 4 °C. La solution est amenée à pH 6 par de la soude 0,1 N juste avant l'emploi. La solution d'eau oxygénée est préparée à partir d'eau oxygénée à 30 p. 100 diluée avec de l'eau distillée bouillie et refroidie.

R4. — La solution de lavage à pH 7,2 est constituée par une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100 additionnée de 0,05 p. 100 de Tween 20.

Tous les réactifs sont de qualité analytique. L'acide amino-5 salicylique est purifié selon la technique proposée par ELLENS (4) : 9 g de 5 AS (Merk) et 9 g de bisulfite de sodium sont dissous dans 1 litre d'eau déminéralisée porté à 80 °C. A cette solution, on ajoute 4 g de charbon végétal en poudre, on agite pendant 5 minutes et on filtre. Le filtrat est refroidi rapidement à + 4 °C, les cristaux sont ensuite recueillis sur filtre Büchner, séchés et conservés en flacon brun à + 4 °C. Tous les tampons sont conservés à + 4 °C. L'antigène reconstitué est réparti en fractions unitaires et conservé en congélateur.

MÉTHODE

La méthode E.L.I.S.A. développée comprend quatre étapes :

1. Le tapissage des cupules par l'antigène toxoplasmique

Chaque cupule reçoit 100 microlitres de la suspension antigénique diluée dans le tampon carbonate 0,1 M de pH 9,6 (R1). La dilution choisie de 1/500 correspond à un optimum d'antigène protéique fixé sur la paroi des cupules. Les plaques sont maintenues une nuit à + 4° et, après rejet de la solution d'antigène par retournement brusque, sont soumises à 3 lavages successifs avec la solution de chlorure de sodium (R4). Il est important de laisser la solution de lavage en contact 3 minutes et de ne pas dépasser le volume de 200 microlitres par cupule.

2. Incubation avec le sérum animal à tester

On introduit dans chaque cupule 100 microlitres de sérum dilué dans le tampon PBS Tween identique à celui utilisé pour la dilution de l'antiglobuline (R2). A l'étude sur plusieurs dilutions qui permet une détermination appro-

chée du titre en anticorps, trop longue pour un dépistage systématique, a été préférée l'utilisation d'une dilution unique au 1/80 répétée 2 fois. Les plaques sont placées 2 heures à 37 °C puis soumises à 3 lavages avec la solution (R4), après élimination par retournement brusque de la dilution du sérum. Chaque analyse comprend deux sérums étalons positifs de titres différents et un sérum négatif, ainsi qu'un blanc réactif.

3. Incubation avec le conjugué

Les anticorps de lapin anti-immunoglobines ovines marqués à la peroxydase (R2), dilués au 1/1 600 sont déposés sous un volume de 100 microlitres dans toutes les cupules. Les plaques sont placées 1 heure à 37 °C, puis lavées 3 fois avec la solution de lavage (R4).

4. Addition du substrat et lecture

On ajoute dans toutes les cupules 100 microlitres de la solution du système révélateur (R3). Sous l'action de l'enzyme, l'acide amino-5 salicylique est transformé en dérivé de coloration brun orangé. Après incubation pendant 60 minutes entre 20 et 25 °C (au-delà de cette température la réaction est bloquée), l'intensité de la coloration est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (densitomètre PHI 5 Vernon couplé à un calculateur HP 97 S), d'où l'on déduit pour la moyenne de chaque sérum l'écart de densité optique ΔDO avec un lot de témoins sérums négatifs. La lecture peut s'effectuer également par appréciation visuelle.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CONDITIONS OPÉRATOIRES

De façon à obtenir le meilleur contraste entre les sérums positifs et négatifs, les conditions optimales sont fixées lors d'essais préliminaires pour :

— Taux de dilution de l'antigène : la dilution au 1/500 retenue est la plus faible et plus reproductible car elle donne le maximum de DO.

— Taux de dilution du sérum : la dilution au 1/80 correspond à un écart de DO satisfaisant entre sérum positif et un sérum négatif.

— Taux de dilution de l'immunconjugué : la dilution au 1/1 600 retenue correspond à une DO minimale pour un sérum négatif et un écart satisfaisant avec les sérums positifs tout en éliminant les adsorptions non spécifiques (dilution < 1/400) ou insuffisantes (dilution > 1/3 200).

Comme l'ont indiqué ROFFI et collab. (9), il est avantageux d'ajouter un tampon de dilution 0,5 de gélatine, ce produit étant aussi efficace et moins onéreux que l'ovalbumine préconisée antérieurement. Parmi les nombreux chromogènes utilisables pour mesurer l'activité peroxydasique, nous avons retenu l'acide amino-5 salicylique utilisé par RUITENBERG (10), substrat dénué par ailleurs de propriétés photosensitives et mutagéniques (13). L'étude cinétique de la coloration à l'acide amino-5 salicylique montre que le maximum est atteint en 60 minutes pour rester stable quelques heures. L'arrêt de la réaction par la soude est abandonnée ne présentant pas d'intérêt dans nos conditions d'analyses. Il a été remarqué que cette addition entraîne des modifications variables de DO selon les sérums et selon leur teneur en anticorps. La perturbation de la coloration entraîne une lecture densitométrique non reproductible.

DÉTERMINATION DU TITRE EN ANTICORPS

Il n'existe actuellement aucune formule générale pour exprimer le titre en anticorps. La méthode la plus souvent utilisée est celle de la dilution finale : le titre en anticorps est alors défini comme la dilution la plus haute pour laquelle la valeur de la densité optique ne diffère pas de façon significative de celle d'un sérum négatif.

VAN LOON et VAN DER VEEN (12) ont montré que « différer de façon significative pouvait être considéré comme différer de 3 écarts types avec la densité optique moyenne d'un ensemble de sérums négatifs ».

La détermination du titre en anticorps par la méthode de dilution finale étant trop longue et trop onéreuse dans le cadre d'une enquête épidémiologique, il lui a été préféré la technique de la dilution unique dont le principe est d'opérer sur une seule dilution répétée 2 fois. En tenant compte de cet impératif, la détermination d'un titre en anticorps nécessite

la constitution d'un pool de sérums négatifs comme témoin négatif et l'établissement d'une courbe étalon à partir de sérums positifs de titres différents.

1. Témoins sérums

On a déterminé la DO moyenne et l'écart type pour 50 sérums négatifs dilués au 1/80 et la DO du pool négatif dilué au 1/80 constitué à l'aide de ces sérums. La valeur de l'absorption correspondant à 3 écarts types est apparue comme étant égale à 40 de la DO du pool négatif, ce qui donne une valeur de $DO = 0,08$. Par la suite, sera considéré comme titre en anticorps du sérum traité, la dilution pour laquelle la différence de DO ou ΔDO , entre le sérum et le témoin négatif à la même dilution du 1/80 sera égale à 0,08.

2. Courbe étalon standard

Cinq sérums de titres différents sont testés par la méthode de dilution finale, ainsi que le témoin sérum négatif. On peut ainsi établir pour chaque sérum la courbe $\Delta DO = f(\log \text{ dilution})$ (ΔDO représentant l'écart de densité optique entre le sérum et le témoin négatif à la même dilution). Le programme d'« ajustement de courbe » appliqué au calculateur HP 97 S permet, à partir des 7 points obtenus pour chaque sérum, d'obtenir les droites de la figure 1. Ces courbes du type $y = ae^{bx}$ présentent des pentes permettant de les assimiler à des droites parallèles et de là de construire une courbe standard $\Delta DO = f(\text{titre})$ pour une dilution donnée du sérum.

Dans nos conditions d'analyses, la densité optique du sérum de contrôle (pool de sérums négatifs) dilué au 1/80 étant de 0,2, 40 p. 100 de cette densité optique représente donc une $DO = 0,08$. L'intersection entre les droites $\Delta DO = f(\log \text{ dilution})$ et la valeur $DO = 0,08$ figure 2 donne le titre ELISA des 5 sérums (tabl. I).

TABLEAU I. — Titre ELISA des sérums et correspondance avec la ΔDO pour la dilution du 1/80

Sérums	ΔDO	Titre ELISA
1	0,63	1/5 300
2	0,57	1/3 800
3	0,49	1/1 700
4	0,40	1/800
5	0,32	1/430

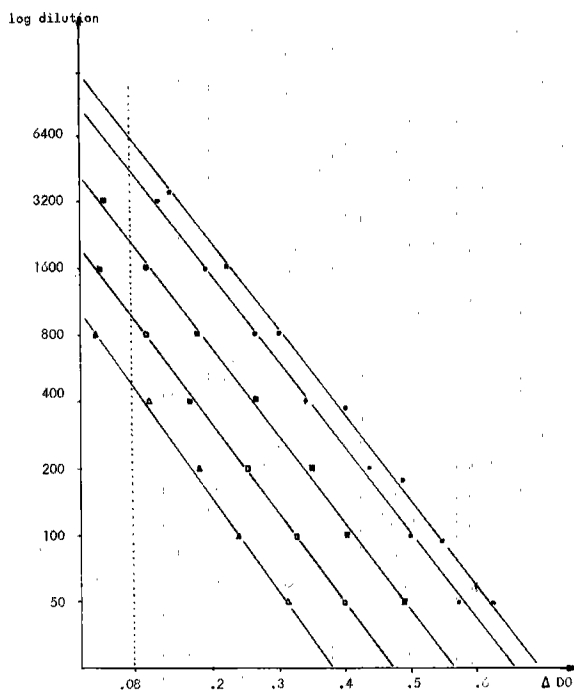


Figure 1 - détermination des titres en anticorps de cinq sérums par la méthode de dilution finale.

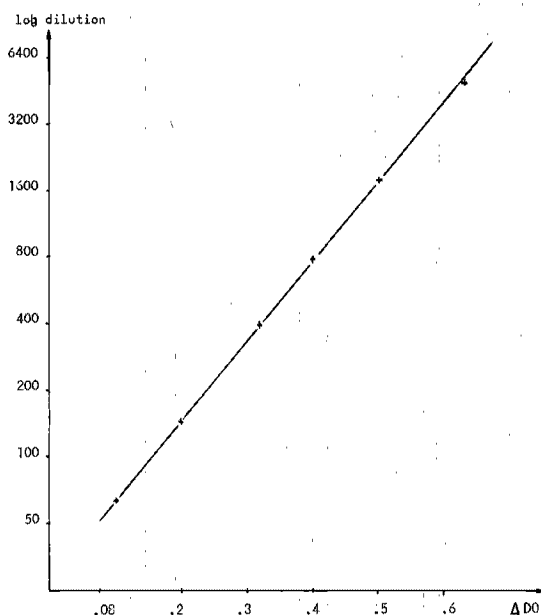


Figure 2 - courbe standard de détermination du titre en anticorps exprimé comme la dilution pour laquelle la valeur de DO ne diffère pas de celle d'un sérum négatif.

La corrélation entre le titre obtenu par la méthode de dilution finale et celui obtenu par la seule dilution au 1/80 donne un coefficient de 0,98.

COMPARAISON AVEC LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Les résultats obtenus de la comparaison de la technique IFI et ELISA figurent au tableau II. Ces résultats montrent qu'il y a concordance satisfaisante dans 86 p. 100 des cas entre les deux méthodes et que chaque méthode « laisse passer » quelques taux intermédiaires avec l'autre méthode en proportions équivalentes. La comparaison des titres des sérums positifs obtenus par les deux méthodes et indiquée par la figure 3 montre que celui retenu pour ELISA est plus élevé que celui obtenu en IFI mais que la correspondance d'ensemble est satisfaisante.

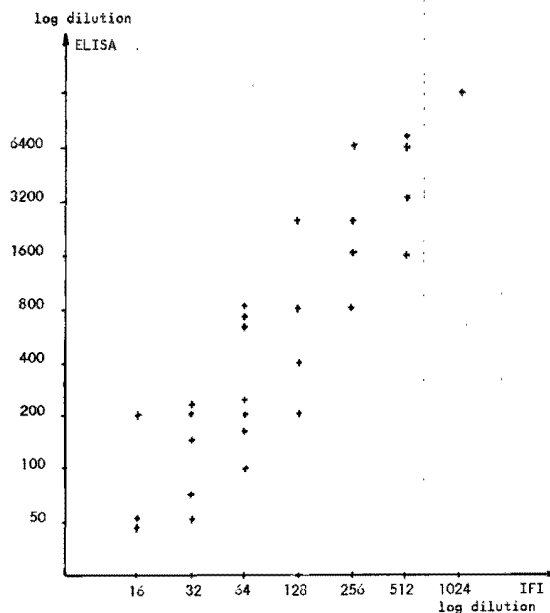


Figure 3 - comparaison du titre en anticorps de sérums positifs obtenus selon la méthode de dilution finale en ELISA et IFI (d'après tableau I).

TABLEAU II. — Résultats obtenus selon la méthode de dilution finale pour 50 sérums par la méthode ELISA et IFI

ELISA \ IFI	IFI		
	⊖1/16	⊕1/128	⊕
⊖ — DO = 0,08 ou 1/80	14	3	0
⊕ — DO = 0,3 ou 1/360	4	9	2
⊕	0	6	12

ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE DANS L'ISÈRE

L'étude porte sur environ 2 p. 100 de brebis mères, ce qui représente au total 816 sérums répartis au niveau du département en fonction de la localisation plus ou moins importante du cheptel selon les cantons. Les valeurs obtenues pour l'ensemble du département indiquent que 22 p. 100 des animaux présentent une sérologie négative, 54 p. 100 une sérologie à taux intermédiaires et 24 p. 100 une sérologie positive de titre ELISA > 1/360 ou IFI > 1/128.

CONCLUSION

Le point délicat de la technique ELISA et son adaptation à un diagnostic sérologique est de disposer d'un antigène suffisamment pur et spécifique, capable de se fixer électivement sur les parois des cupules de la microplaque. La dilution au 1/500 en tampon carbonate pH 9,6 correspond à l'optimum de fixation de l'antigène dans nos conditions d'analyses.

Le système de visualisation de la réaction antigène anticorps est constitué par des réactifs courants : un immunconjugué marqué à la peroxydase, et l'acide amino-5 salicylique purifié comme substrat révélateur. Cette purification indispensable, mais facilement réalisable, permet d'obtenir une coloration stable et une augmentation de la sensibilité de la réaction sans modification défavorable du témoin réactif et du témoin sérum négatif.

La valeur ΔDO obtenue par différence entre la DO moyenne du sérum testé et la DO du témoin sérum négatif à la même dilution, est comparée à une courbe étalon standard expérimentale pour déterminer le titre en anticorps du sérum. Dans nos conditions d'analyses, la dilution unique choisie est au 1/80. Cette dilution correspond à un écart de DO satisfaisant

entre sérum positif et sérum négatif. Elle a par ailleurs l'avantage de correspondre à un seuil de sensibilité en technique IFI.

La comparaison entre les techniques ELISA et IFI est satisfaisante, la concordance est en effet de 86 p. 100.

Mise à part la purification, facilement réalisable au laboratoire, de l'acide amino-5 salicylique, la plupart des réactifs se trouvent facilement sur le marché sous une présentation lyophilisée, donc de bonne conservation. Les possibilités de lecture visuelle et automatique au moyen d'un appareil robuste, alliées à une grande stabilité de la coloration et à des conditions opératoires simples et automatisables

font de l'ELISA une technique de choix pour les enquêtes épidémiologiques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur collaboration technique, Mademoiselle C. UGNON, Messieurs P. DEBERGE et J. BON. Nous avons apprécié les encouragements de Monsieur P. BEAUFRÈRE, Directeur des Services Vétérinaires Départementaux de l'Isère ainsi que de Monsieur TURQUAND, Directeur du Laboratoire. Le sérum de référence nous a été fourni gracieusement par le Laboratoire national de Pathologie des petits Ruminants de Nice et les antigènes par la firme Biomérieux.

SUMMARY

Application of an ELISA technic to the serological diagnostic of sheep toxoplasmosis : its interest for the sahelian small ruminants

A microplate enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of sheep toxoplasma antibodies is described, using peroxidase labelled immunoglobulins and using a purified 5-aminosalicylic acid as the substrate. The good stability of the coloration permits a reading method using a Vernon spectrophotometer allowing a direct reading to be taken in the well of the microtitration plate or to visualize directly.

For african epidemiological surveys, this technic is developed using a single serum dilution in conjunction with an experimental standard curve of titers determined by an end point dilution ELISA. A correlation was found between the results obtained with ELISA and IFI.

RESUMEN

Aplicación de una técnica ELISA al diagnóstico serológico de la toxoplasmosis ovina : su interés para los pequeños rumiantes sahelianos

Los autores presentan una técnica de diagnóstico inmunoenzimático (ELISA) en microlámina de la toxoplasmosis ovina, utilizando un conjugado marcado por la peroxidación y el ácido amino-5-salicílico purificado, como sustrato revelador. La coloración muy estable permite una lectura ya visual ya con el densímetro Vernon, directamente en las láminas de microtitración.

Durante un estudio epidemiológico en los pequeños rumiantes en medio africano, dicha técnica permite, para determinar la dosificación de anticuerpos de un suero, la utilización del método de dilución única en comparación con una curva patrón standard. Esta última se obtiene a partir de sueros positivos, dosificados según la técnica de la dilución final. Una concordancia satisfactoria existe con el método IFI.

BIBLIOGRAPHIE

1. BRAVENY (I.), JANSSEN (H.), DISKO (R.). Significance of raw meat and cats as sources of toxoplasmosis. *Burd gesund heisblatt*, 1977, 20 : 259-260.
2. CALAMEL (M.). La toxoplasmosis abortiva chez les ovins - caprins. Nice, Lab. Path. Petits Ruminants, 1981.
3. CARLIER (Y.) et collab. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis. *Bull. Wld Hlth Org.*, 1980, 58 : 99-105.
4. ELLENS (D. J.), FIELKENS (A. L. J.) A simple method for the purification of 5 amino salicylic acid application of the product as substrate in ELISA. *J. Immunol. Methods*, 1980, 37 : 325-332.
5. FALADE (S.). *Toxoplasma gondii* antibodies in nigerian goats. *Trop. animal Hlth Prod.*, 1978, 10 (3) : 175-177.
6. GARIN (J. P.) et collab. Recherches épidémiologiques sur la toxoplasmosis primaire humaine et animale au Sénégal. *Méd. Afr. noire*, 1971, 18 (10) : 751-754.

7. LINKLATER (K. A.), DYSON (D. A.). Field studies on enzootic abortion of ewes in south east scotland. *Vet. Rec.*, 1979, **105** (17) : 387-389.
8. MUNDAY (B. L.). The epidemiology of the toxoplasmosis with particular reference to the tasmanian environments. Depart. Agric. Hobart, 1970.
9. ROFFI (J.), DETROUIN (F.), DIALLO (P. B.). Application d'une méthode immunoenzymatique (ELISA) au dépistage de la trypanosomiase humaine africaine à *T. gambiense*. *Méd. Mal. infect.*, 1978, **8** : 9-14.
10. RUITENBERG (E. J.). The Enzyme Linked Immunosorbent Assay and its application to parasitic infections. *J. infect. Dis.*, 1977, **136** (Suppl. Oct.) : 267-273.
11. TAINTURIER (D.), FERNEY (J.), ROYAL (L.) Avortements infectieux de la brebis. *Cah. Méd. vét.*, 1980, **49** : 25-34.
12. VAN LOON (A. M.), VAN DER VEEN (J.). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. *J. clin. Path.*, 1980, **33** : 635-639.
13. VOOGD (C. E.) et collab. On the mutagenic action of some enzyme immunoassay substrates. *J. immunol. Methods*, 1980, **36** : 55-61.